



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

**Efectos de la administración aguda y crónica de
la metanfetamina en los índices de proliferación
celular en el hipocampo de rata adolescente y
adulta.**

Miguel Arash Enseñat Méndez

Grado de Biología

Año académico 2014-15

DNI del alumno: 43182098N

Trabajo tutelado por M^a Julia García Fuster
Departamento de Biología



Se autoriza a la Universidad a incluir mi trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas y se investigación.

Palabras clave del trabajo: Adicción, adolescente, adulto, drogas de abuso, giro dentado, hipocampo, metanfetamina, neurofarmacología, neurogénesis, proliferación celular, rata.

ÍNDICE

1. Resumen	2
2. Introducción	3
2.1. Proliferación celular y neurogénesis	3
2.2. Metanfetamina	8
2.3 Relación dosis rata-humano	11
3. Objetivos	11
4. Materiales y métodos	12
4.1. Tratamiento y obtención de muestras	12
4.2. Inmunohistoquímica	13
4.3. Recuento celular	14
4.4. Análisis estadístico	14
5. Resultados	14
5.1. Proliferación celular basal en rata adulta y adolescente	14
5.2. Efecto agudo y crónico de la metanfetamina sobre rata adulta y adolescente	15
6. Discusión	17
7. Conclusión	20
8. Agradecimientos	20
9. Bibliografía	20

RESUMEN

La proliferación celular es un proceso que ocurre en mamíferos adultos en la zona subgranular (SGZ) del giro dentado (DG) del hipocampo y en la zona subventricular, y es la primera fase del proceso de neurogénesis, que juega un importante rol en la capacidad cognitiva y procesos de aprendizaje del adulto. La proliferación celular se ve influenciada por ciertos factores, y se conoce que algunas drogas de abuso como la metanfetamina, afectan a sus niveles. En el presente estudio se estudia el efecto de la administración crónica y aguda de metanfetamina sobre los índices de proliferación celular en el DG del hipocampo de ratas adultas y adolescentes. Se realizó un conteo de células Ki-67 positivas de nueva proliferación, marcadas mediante una tinción inmunohistoquímica. Los resultados obtenidos demuestran diferencias en los índices de proliferación celular basal de adultos y adolescentes, y una reducción significativa de la proliferación celular en el DG de adultos después de la administración crónica de metanfetamina. Esta reducción no fue vista en el tratamiento agudo ni en adolescentes, lo que sugiere un efecto diferencial según el tratamiento y una mayor resistencia a la metanfetamina por parte de las ratas adolescentes.

Cellular proliferation is a process observed in adult mammals in subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus (DG) of the hippocampus and in subventricular zone. It is the first phase of the neurogenic process, which plays an important role in cognitive capacities and in learning processes in adults. Cellular proliferation is influenced by many factors, and it is known that some drugs like methamphetamine can affect its levels. In the present study, we study the effect of chronic and acute methamphetamine administration on cellular proliferation in the DG of adult and adolescent rats. A Ki-67 positive, new proliferation cell counting was made, where the cells were marked by an immunohistochemistry. The results obtained show differences between basal cellular proliferation in adults and adolescents, and a significant depletion of cellular proliferation in adult DG after methamphetamine chronic administration. This reduction was not seen in acute treatment and in adolescents, what suggests a differential effect depending on treatment and a major methamphetamine resistance by adolescent rats.

INTRODUCCIÓN

PROLIFERACIÓN CELULAR Y NEUROGÉNESIS

La proliferación celular en el hipocampo de mamíferos adultos es un descubrimiento relativamente reciente, y sabemos que en una región del giro dentado del hipocampo, la zona subgranular (SGZ), encontramos células progenitoras neurales multipotenciales, capaces de dar lugar a neuronas y astrocitos. También existe proliferación celular en otra zona del cerebro, la zona subventricular de los ventrículos laterales, donde las células migran hasta el bulbo olfatorio donde se convierten en neuronas granulares y periglomerulares. La proliferación celular es el primer paso de la neurogénesis, es decir, de la aparición de nuevas neuronas (mirar revisión de Zhao, 2008).

La neurogénesis en el hipocampo de los mamíferos adultos es un modo de plasticidad, que permite adaptarse al entorno y responder a estímulos externos o internos con mayor facilidad, por ejemplo en situaciones donde hay que distinguir entre dos situaciones similares, teniendo por tanto una función importante relacionada con la memoria y el aprendizaje (Clelland et al., 2009). Se conoce que hay una correlación entre los niveles de neurogénesis en el hipocampo y el aprendizaje relacionado con la memoria espacial, y se ha observado que en ratones con neurogénesis reducida en el hipocampo, hay un empeoramiento en el rendimiento en ciertas pruebas como el Morris water maze (tareas dependientes del hipocampo). Esta reducción se puede deber a, como ya hemos comentado, la edad, o a otros factores como el consumo de drogas y el estrés.

Las células madre neurales adultas son células que se encuentran en el sistema nervioso central adulto y que tienen la capacidad de renovarse y diferenciarse en otros tipos de células neuronales, tales como neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, y son las células principales relacionadas con el proceso de neurogénesis (Gage, 2000). Podemos diferenciar una serie de etapas en el proceso de neurogénesis: Fase 1: Proliferación. Se ha sugerido que un subconjunto de astrocitos puedan ser las células que actúan como precursoras, y que tienen sus cuerpos celulares en la zona subgranular (SGZ) del giro dentado (DG) del hipocampo. Fase 2: Diferenciación. Las células se diferencian en neuronas inmaduras. Fase 3: Migración. Las neuronas inmaduras migran una corta distancia hasta la capa granular. Fase 4: Maduración. Las neuronas inmaduras extienden sus proyecciones axonales hasta la capa de células piramidales *cornu ammonis 3* (CA3) (4-10 días tras división). Entonces, envían sus dendritas en dirección opuesta hacia la capa molecular (2 semanas tras división), donde mantienen el crecimiento durante meses para aumentar su complejidad. Fase 5: Integración sináptica. Las nuevas neuronas granulares reciben señales desde la corteza entorrinal y envían señales hacia CA3 y regiones del hilus (ver revisión de Ming y Song, 2005) (Fig. 1).

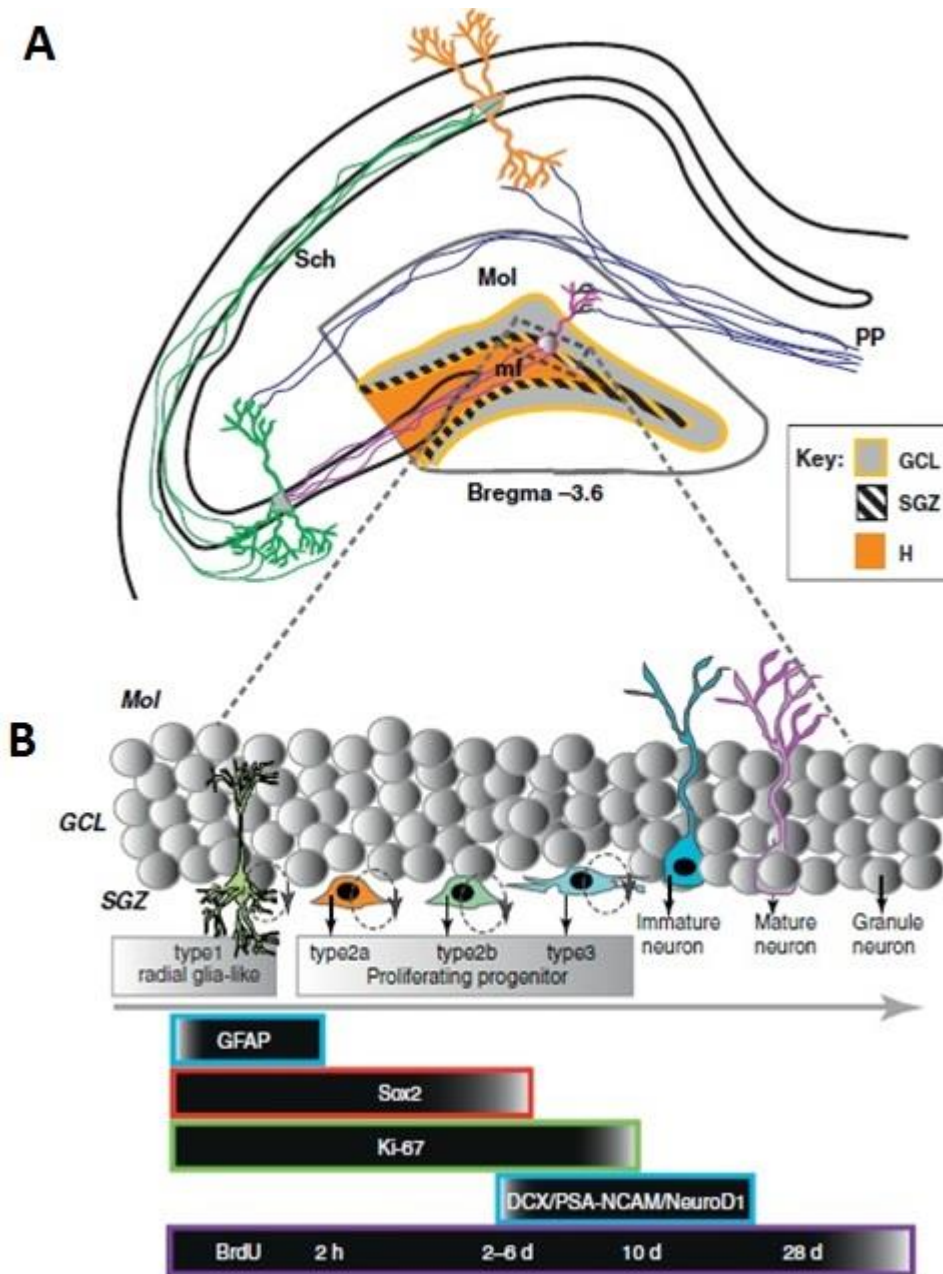


Figura 1: Imagen extraída de Mandyam y Koob (2012). A) Sección coronal del cerebro adulto de rata en bregma -3.60 mm, resaltando el giro dentado (DG) del hipocampo. Se encuentran indicadas la capa granular (GCL), la zona subgranular (SGZ) y el hilus (H). B) Esquema de las fases de la proliferación celular en el DG de mamíferos. Fase 1: Proliferación. Las células madre tienen sus cuerpos celulares en la zona subgranular del giro dentado. Las nuevas células que aparecen durante esta fase se pueden observar utilizando una tinción inmunohistoquímica de Ki-67, visible durante toda la fase de proliferación. También se puede utilizar GFAP y Sox2 como marcadores. Fase 2: Diferenciación. Las células de nueva aparición se diferencian en neuronas inmaduras. Los marcadores utilizados en esta fase son DCX, PSA-NCAM y NeuroD1. Fase 3: Migración. Las neuronas inmaduras migran una corta distancia hasta la capa granular. Fase 4: Las neuronas inmaduras extienden sus proyecciones axonales hasta la capa de células piramidales CA3. Entonces, envían sus dendritas en dirección opuesta hacia la capa molecular. Fase 5:

Integración sináptica. Las nuevas neuronas granulares reciben señales desde la corteza entorrinal y envían señales hacia CA3 y regiones del hilus, siendo ya completamente funcionales.

De todas las nuevas células que aparecen diariamente, solamente una tercera parte sobrevive (Cameron y McKay, 2001), de manera que la aparición de células progenitoras multipotenciales no implica necesariamente neurogénesis, sino que la proliferación celular solo es el primer paso de la neurogénesis. De esta manera, aunque están estrechamente relacionados y se puede utilizar el índice de proliferación celular como marcador del índice de neurogénesis, hay que tener claro que son dos conceptos diferentes, y que en ciertos casos, los efectos de aumento o reducción de la neurogénesis no se producen en la fase de proliferación celular sino en otras, y que por tanto, los experimentos realizados utilizando el índice de proliferación celular, como es el caso, pueden no ser totalmente representativos de los niveles totales de neurogénesis, ya que una vez finalizada la etapa de proliferación celular, estas nuevas células sufren un proceso de maduración, que incluye migración a otras áreas cerebrales, que puede durar alrededor de 2 meses, tiempo durante el cual proyecten eferencias y reciben aferencias de la región CA3 (Song et al., 2006).

Como hemos comentado, no toda la proliferación celular que aparece en el hipocampo se considera neurogénesis, sino que existen unos criterios para determinar a partir de que punto consideramos que se trata de neurogénesis: las células deben sobrevivir al menos 28 días y ser diferenciadas a neuronas, ya que en la etapa de proliferación celular, lo que aparece son células multipotenciales, que podrían ser diferenciadas a otros tipos de célula (células gliales) o no llegar a diferenciarse, de manera que podría ser que no lleguen a formar neuronas (Kempermann et al., 2003).

KI-67

Ki-67 es una proteína nuclear que se encuentra totalmente asociada a la proliferación celular, de manera que solo aparece en las células de nueva proliferación. Concretamente, se expresa especialmente entre el final de la fase G1 y la fase M. No se conoce muy bien su función, aunque parece ser que es una proteína altamente necesaria para que se lleve a cabo correctamente la mitosis.

Estas características hacen que esta proteína sea idónea para ser marcada para encontrar las células de nueva proliferación en muestras de tejido, ya que se pueden cuantificar mediante una tinción inmunohistoquímica para detectar esta proteína, seguida de contaje con microscopio, lo que es de alta utilidad para ciertas enfermedades y para investigaciones como la llevada a cabo, donde un anticuerpo es utilizado para marcar el Ki-67, posibilitando la detección de células de nueva proliferación en el giro dentado.

Este procedimiento es el llevado a cabo en la gran mayoría de experimentos de este tipo, donde se puede hacer un recuento de las células de nueva proliferación en el giro dentado en las pasadas 24h, que es el tiempo aproximado durante el cual se expresa esta proteína (Scholzen, 2000).

REGULACIÓN

La proliferación celular en el hipocampo es un proceso altamente regulado, que puede ser modificado por muchas variantes. El factor más importante y conocido que reduce la tasa de proliferación celular es la edad, ya que se conoce claramente que los individuos de más edad presentan unos niveles de

proliferación celular significativamente inferiores a los de individuos más jóvenes (Molofsky et al., 2006). Otro factor que reduce significativamente los niveles de proliferación celular es el estrés (Klempin and Kempermann, 2007). Se sabe también que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) promueve la proliferación celular, y que es necesario para observar los aumentos de proliferación que se ven en diversos experimentos (Cao et al., 2004), ya que algunos factores como el ejercicio voluntario y el enriquecimiento ambiental han demostrado la capacidad de aumentar el nivel de proliferación celular en ratas adultas (van Praag et al., 2005). Otro factor que se ha apuntado que podría tener un rol en el control de los niveles de neurogénesis es el estrés oxidativo (Limoli et al., 2006), y se ha estudiado que la melatonina, por su papel como antioxidante, puede tener un papel importante en mantener los niveles de neurogénesis en situaciones de elevado estrés oxidativo (Manda y Reiter, 2010).

La dopamina (DA), al actuar como neurotransmisor, es capaz de aumentar la neurogénesis en ciertas zonas y disminuirla en otras (Díaz et al., 1997), aunque sus efectos pueden parecer algo contradictorios en la proliferación celular en el DG de mamíferos adultos, ya que dosis incrementadas de dopamina aumentan los niveles de proliferación celular, pero algunas drogas como la cocaína o la metanfetamina, que aumentan los niveles de dopamina en el cerebro, presentan efectos de reducción de la proliferación celular. Este efecto aparentemente contradictorio se puede explicar a partir de los subtipos de receptor de dopamina, ya que cuando producimos denervación dopaminérgica (que inhibe la proliferación celular) el receptor asociado es el receptor D₂, mientras que el aumento de dopamina tras la administración de cocaína y metanfetamina, está asociada con el receptor D₁ (Hoglinger et al., 2004; Harvey, 2004).

La neurogénesis en adultos se ve reducida ante la acción de algunas drogas de abuso, principalmente psicoestimulantes, que actúan como tóxicos frente a la proliferación celular en el hipocampo, como son el alcohol (Morris et al., 2010), la cocaína (García-Fuster et al., 2010) y la metanfetamina (Teuchert-Noodt et al., 2000).

DROGAS DE ABUSO Y ADICCIÓN

El consumo de drogas de abuso como la metanfetamina puede producir una fuerte adicción, que podemos considerar como un trastorno crónico recurrente asociado con el consumo continuado de drogas, asociado con una pérdida del control sobre el consumo de éstas. Podemos separar 3 fases en el ciclo de la adicción: Intoxicación producida por el consumo (1), retirada de las drogas, caracterizada por sensaciones de displacer (2) y preocupación o ansia (“craving”), relacionado con la búsqueda de drogas (3) (ver Review de Mandyam y Koob, 2012).

El estriado ventral es una región que incluye el núcleo accumbens y que se considera vital para las sensaciones de recompensa, relacionadas con el comportamiento de búsqueda de drogas, y la liberación de DA en esta región, modulada por ciertas drogas como la cocaína y la metanfetamina que producen incrementos en su concentración (Gold, 1989; Bennett, 1998), tiene un papel vital para producir los efectos de recompensa asociados a la droga, aunque se conoce que existen otros neurotransmisores involucrados. El núcleo accumbens recibe señales desde otras regiones como el córtex medio prefrontal, la amígdala, la ínsula y regiones del hipocampo, que juegan un importante papel en los recuerdos asociados con la droga, de manera que podemos considerar que el núcleo accumbens, y por tanto el estriado ventral, es la zona del cerebro donde se producen los mayores efectos relacionados con la

adicción (Koob y Volkow, 2010). Aun así, el hipocampo también se encuentra involucrado en la adicción, y concretamente la integridad hipocampal se asocia con los recuerdos de recompensa de la droga y por tanto es fundamental en la formación de recuerdos que se asocian con el aumento del comportamiento de búsqueda de droga (Black et al., 2004; Fuchs et al., 2005). También existe un efecto de la neurogénesis en el comportamiento de la adicción, ya que se cree que las nuevas neuronas aparecidas en el hipocampo pueden bloquear los recuerdos que motivan hacia la búsqueda de drogas (Canales, 2007), de manera que una reducción en la neurogénesis puede producir que los recuerdos que produce la adicción duren más tiempo en el cerebro adicto (Noonan et al., 2010). Para una lista más completa de efectos de las drogas de abuso sobre la neurogénesis, ver Tabla 1. Además, durante el consumo de droga, el córtex medio prefrontal interacciona con el hipocampo, y un consumo excesivo puede comprometer el aprendizaje y los sistemas de memoria, y además de afectar a los sistemas de recompensa, asociados al ansia o abstinencia, puede producir efectos negativos sobre el control de la toma de decisiones, un efecto ampliamente observado en adictos (Koob y Le Moal, 1997).

Stage	Source of reinforcement	Animal models	Hippocampal neurogenesis ^a		
			Proliferation	Immature neurons	Mature neurons
Binge/Intoxication	Positive reinforcement	<i>Conditioned place preference</i>			
		- MDMA	-	ND	-
		- Cocaine	-	ND	-
		<i>Drug self-administration</i>			
		- Methamphetamine			
		- Intermittent access (1h/d, 2d/w)	↑	↑	-
		- Limited access (1h/d, 5d/w)	↓	↓	↓
		- Cocaine			
		- Limited access (1h/d, 7d/w)	↓	ND	↓
		- Extended access (>4h/d, 5d/w)	↓	↑	-
		- Nicotine			
		- Limited access (1h/d, 5-7d/w)	↓	↓	ND
		- Heroin			
		- Extended access (6h/d, 7d/w)	↓	ND	ND
- Alcohol					
- Nondependent drinking (30m/d, 5d/w)	↓	↓	↓		
Withdrawal/ Negative affect	Negative reinforcement	<i>Conditioned place aversion</i>		No data	
		<i>Increased self-administration during dependence</i>			
		- Methamphetamine			
		- Extended access (6h/d, 5d/w)	↓	↓	↓
		- Cocaine			
		- Extended access (>4h/d, 5d/w)	-	-	ND
- Alcohol					
- Excessive drinking during dependence	↓	↓	↓		
Relapse	Conditioned positive and negative reinforcement	<i>Cue-induced reinstatement</i>		No data	
		<i>Stress-induced reinstatement</i>		No data	
		<i>Protracted abstinence/withdrawal</i>			
		- Extended access cocaine (14d)	↓	↓	ND
- Extended access cocaine (28d)	-	↑, -	-, ND		

^a-, no change; ↑, increase; ↓, decrease; ND, not determined.

Tabla 1: Tabla extraída de Mandym y Koob (2012). Efectos de diferentes drogas de abuso sobre la neurogénesis en modelos animales de adicción a drogas.

METANFETAMINA

La metanfetamina (Fig. 2) es una droga de abuso, perteneciente a la familia de las anfetaminas, y ampliamente consumida en la actualidad, principalmente en el mundo occidental. Es un compuesto psicoestimulante, que produce efectos como euforia e incremento de la energía y concentración, con casos también de aumento de la violencia (a corto y largo plazo), aunque en dosis más elevadas puede producir efectos secundarios a corto plazo tales como psicosis y hemorragias cerebrales. A largo plazo, especialmente cuando es consumida de manera crónica, presenta otros efectos, sobre todo a nivel del SNC, como la disminución del volumen del hipocampo, produciendo pérdidas de memoria asociadas al hipocampo (Thompson et al., 2004) y disminución de neurogénesis en adultos, observada tanto en tratamientos agudos (Teuchert-Noodt et al., 2000) como crónicos (Mandyam et al., 2008).

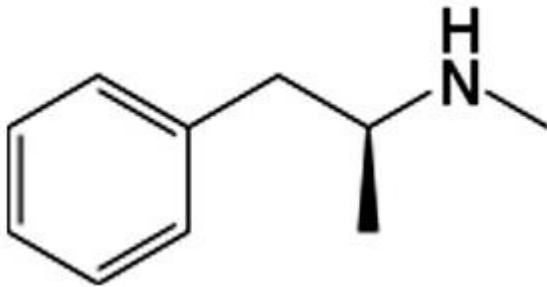


Figura 2: Estructura química de la metanfetamina.

La metanfetamina es una droga de absorción muy rápida, especialmente cuando es inyectada por vía intravenosa o cuando es fumada. Se metaboliza principalmente en el hígado, mediante N-demetilación (produciendo el metabolito anfetamina, también relevante fisiológicamente) y por desaminación (Beckett et al., 1969).

Ante la ingesta o administración aguda de metanfetamina, se produce un aumento en las concentraciones de dopamina (DA) y serotonina (5HT), debido a que la metanfetamina actúa como sustrato para los transportadores de DA (DAT) y de 5HT (SERT), disminuyendo por tanto el transporte de ambos neurotransmisores (Rothamn and Baumann, 2003, Fleckenstein et al., 2007). Además, la metanfetamina también afecta a la función de VMAT-2, produciendo de esta manera también cambios en la concentración de DA (Riddle et al., 2002), y también se produce una reducción de la recaptación de DA, que provoca su aumento extracelular (Bennet, 1998). Otras drogas, como la cocaína, también producen aumentos en los niveles extracelulares de DA (Gold, 1989) y se conoce que la cocaína tiene efectos antiproliferativos en el giro dentado, al igual que los descritos en metanfetamina (Yamaguchi, 2004; Garcia-Fuster, 2010). A largo plazo, este aumento agudo de las concentraciones de DA observado tras la administración de metanfetamina se invierte, ya que se ha observado que, tras el consumo mantenido de metanfetamina, se produce una disminución en las concentraciones de DA en el estriado, hipocampo y corteza prefrontal, que se mantiene a largo plazo (Ricaurte et al., 1980, Wagner et al., 1980, Seiden et al., 1988).

La administración de metanfetamina no solo disminuye la proliferación celular, sino que también disminuye la diferenciación neuronal y la maduración de las células progenitoras, de manera que

disminuye a la neurogénesis de maneras diferentes (Bento et al. 2011). En cuanto a la disminución de la proliferación celular, se ha visto que retrasa el ciclo celular en el paso de fase G0/G1 a fase S (Baptista, 2014). Otros estudios sugieren que la disminución de la proliferación celular debida al consumo de metanfetamina se debe a un aumento de la expresión de la proteína supresora de tumores p53, y de la proteína inhibidora del ciclo celular p21, produciendo la acumulación en el núcleo celular de p21 e inhibiendo, por tanto, la neurogénesis (Ekthuwapranee et al. 2015).

En estudios *in vitro* con células progenitoras neurales se ha visto que, además de producir efectos de disminución de la proliferación celular, también existe una afectación de los niveles de apoptosis, que se ven significativamente aumentados ante altas concentraciones de metanfetamina. Este efecto parece estar mediado por un aumento del estrés oxidativo y nitrosativo, que comentaremos también posteriormente. Todos estos efectos son dependientes de dosis, aumentando los efectos en dosis elevadas (Venkatesan, 2011). El mencionado estrés oxidativo se debe al aumento en las concentraciones de DA, que aumenta la formación de superóxido y peróxido de hidrógeno debido al incremento del metabolismo de la DA por la monoamino oxidasa-A (LaVoie y Hastings, 1999). Este estrés oxidativo puede producir severos problemas en el organismo, produciendo problemas de neurotoxicidad, y además, el consumo de metanfetamina también produce efectos inflamatorios en ciertas zonas, como es el aumento de las dopaquinonas, que pueden también estar provocados por el estrés oxidativo (Kuhn et al., 2006).

Curiosamente, en un estudio realizado en ratas, un paradigma de auto-administración intermitente, no diaria de metanfetamina (0,05 mg/kg/dosis, 1h de acceso intermitente, 2 veces por semana durante 28 días) aumentaba los niveles de proliferación celular y la diferenciación neuronal, mientras que si la auto-administración era diaria (1 h/día o 6 h/día) existía una reducción de la proliferación (Mandyam, 2008).

Se conoce que los adolescentes son más sensibles a los efectos de ciertas drogas, como por ejemplo el alcohol, ya que se ve una mayor disminución de la neurogénesis en adolescentes que en adultos en respuesta a la ingesta aguda de alcohol (Crews et al., 2006), pero no existen estudios comparados que muestren el efecto sobre la proliferación celular en el giro dentado de la administración de metanfetamina de manera aguda y crónica en mamíferos adolescentes.

ADOLESCENCIA

La adolescencia es una etapa en la cual el cerebro todavía se encuentra en formación, y se producen una serie de alteraciones o cambios que ocurren durante el proceso de madurez del individuo.

Para el estudio de la adolescencia, el modelo animal más simple y útil es el de la rata y otros roedores, ya que llevan a cabo un proceso similar al humano, y se conoce que la adolescencia es una etapa altamente conservada durante la evolución (Savin-Williams, 1989). Cuando se realiza un estudio con animales intentando reflejar la adolescencia en humanos es importante conocer cuál es la relación entre las etapas vitales de los animales de laboratorio con las de los humanos. En este caso, la etapa que estamos estudiando, la adolescencia, se determina en humanos entre los 12 y los 18 años. En ratas, la adolescencia se puede determinar entre los 28 y los 42 días a partir del nacimiento (PND – postnatal day), basándonos en cambios de comportamiento y neurales, en la pubertad, y en el aumento del crecimiento, aunque podemos ver signos hasta los 55 días (Spear, 2000) y puede variar dependiendo de lo que quiera

reflejar concretamente el estudio, ya que existen distintas etapas en la adolescencia con distintas características fisiológicas y de comportamiento en cada una de ellas. Algunas etapas de la adolescencia son más susceptibles de tener alteraciones o efectos adversos debido al consumo de drogas, y, por ejemplo se conoce gracias a diversos estudios que el inicio de la adolescencia es una etapa de especial sensibilidad hacia el consumo de alcohol (Varlinskaya y Spear 2004).

Podemos separar 5 etapas en el desarrollo de una rata:

- 1- Periodo neonatal: PND 1 a 27
- 2- Adolescencia temprana: PND 28 a 37
- 3- Adolescencia media: PND 38 a 51
- 4- Adolescencia tardía: PND 52 a 60
- 5- Periodo adulto: A partir de PND 60 (Cox et al., 2014)

En nuestro estudio, las ratas adolescentes fueron sacrificadas en el PND 37, mientras que las adultas fueron sacrificadas en el PND 58, lo que implica que se trataba de un estadio de adolescencia temprana y de un estadio de adolescencia tardía-adulto joven.

En diversos estudios realizados con animales de laboratorio se ha observado que las anfetaminas en general, y la metanfetamina en particular, no siguen la tendencia observada en otras drogas, como el alcohol mencionado anteriormente, de tener un mayor efecto en adolescentes que en adultos, lo cual ha sido demostrado en numerosos estudios que muestran una mayor resistencia por parte de los roedores adolescentes a los efectos adversos producidos por la metanfetamina. Estos estudios utilizan marcadores como pueden ser la reducción a largo plazo de los niveles de dopamina (Kokoshka et al., 2000), las diferencias observadas en la respuesta hipertérmica y en la recaptación de dopamina (el principal efecto a corto plazo de la administración de metanfetamina) (Riddle et al., 2002), y otros efectos, aunque en ningún caso se ha utilizado la proliferación celular o neurogénesis como marcador de neurotoxicidad en adolescentes.

Las diferencias observadas en los efectos adversos de la metanfetamina en adolescentes y adultos pueden ser el resultado de la interacción de varios factores, tales como diferencias farmacocinéticas (Spear, 2000), un mayor contenido basal de DA en adultos, y por diferente efecto de VMAT-2, una proteína que atrapa DA citoplasmática hacia el interior de vesículas de almacenamiento para impedir la oxidación de DA, impidiendo así los efectos perjudiciales que esto puede producir, tales como la formación de radicales libres que produzcan estrés oxidativo. Esta VMAT-2 está inhibida por efecto de la metanfetamina, lo que produce un incremento de la concentración de DA citoplasmática. En adultos, los niveles de VMAT-2 son mayores que en adolescentes para contrarrestar los elevados niveles de DA e impedir su oxidación, pero cuando la metanfetamina inhibe su efecto, encontramos unos niveles de DA muy elevados en el citoplasma celular, de manera que puede oxidarse y producir los efectos negativos mencionados anteriormente, relacionados con procesos de estrés oxidativo. Además, se ha observado que una mayor actividad de VMAT-2 se correlaciona con la reducción a largo plazo de los niveles de DA, lo que coincide con la hipótesis de que VMAT-2 influye en la disminución de la recaptación de DA (Truong et al., 2005). Las diferencias farmacocinéticas parecen ser una de las claves en la resistencia de adolescentes a la metanfetamina, ya que se ha visto que, a idéntica dosis (misma concentración), la concentración de metanfetamina en cerebro era el doble en ratas adultas (PND 90) respecto a la

encontrada en ratas adolescentes (PND 40). Aun así, los efectos a corto plazo, concretamente la reducción en la actividad de DAT se presenta de la misma manera en adolescentes que en adultos, lo que implica que las respuestas rápidas del sistema dopaminérgico están menos relacionadas con la edad que las respuestas a largo plazo (Kokosha et al., 2000).

RELACIÓN DOSIS RATA-HUMANO

Para comparar los efectos observados en ratas con los que se observarían en humanos no solo hay que tener en cuenta la edad de la rata, sino que también tenemos que saber cómo se puede comparar la dosis administrada a una rata con la que se administraría a un humano, es decir, la relación que existe entre una cierta dosis en rata y en humano, que se conoce que no es lineal. Para establecer esta relación se utiliza la siguiente fórmula alométrica (Hayes and Kruger, 2014):

$$dosis\ humano\ \left(\frac{mg}{kg}\right) = dosis\ animal\ \left(\frac{mg}{kg}\right) \times \left(\frac{peso\ animal}{peso\ humano}\right)^{1/4}$$

De esta manera, una dosis de 10 mg/kg en una rata adolescente de aproximadamente 120 g (peso aproximado de las ratas en el momento del experimento) corresponde a una dosis de 2 mg/kg en una persona de 70 kg.

La cantidad necesaria de droga para tener el efecto euforizante esperado se ha estimado en cerca de 40-60 mg, aunque muchas veces se toman repetidas dosis en “atracción”, es decir, varias dosis consecutivas poco espaciadas en el tiempo, que incrementan el efecto de la droga y su tiempo de duración respecto al consumo una sola vez (Kish, 2008). Estos valores fueron utilizados para calcular la dosis que había que suministrar a las ratas y se estableció un consumo de 5 mg/kg, en un patrón similar al utilizado en drogas de abuso (“atracción”), con 3 dosis de 5 mg/kg separadas por 3 horas entre cada una de ellas. Como ya hemos visto, una dosis de 10 mg/kg en ratas equivale a 2 mg/kg en una persona de 70 kg, de manera que una dosis de 5 mg/kg equivaldría a 1 mg/kg, por lo que la dosis total inyectada en una persona de 70 kg cada vez sería de aproximadamente 70 mg, similar a la cantidad necesaria para el efecto euforizante. Esta dosis se ha utilizado en otros estudios presentando efectos significativos (Vorhees et al., 2005)

OBJETIVOS

El presente estudio pretende estudiar los efectos de la metanfetamina aguda y crónica sobre la proliferación celular en el giro dentado del hipocampo de rata adulta y adolescente. Mediante este estudio se pretende conocer si alguno de los dos grupos es más susceptible frente a la acción de la metanfetamina, y en tal caso, en qué grado es más susceptible.

MATERIALES Y MÉTODOS

TRATAMIENTO Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Para este estudio se utilizaron un total de 36 ratas Sprague-Dawley macho (Charles River Laboratories, L'Ambresle, Francia), separadas en 2 grupos de 18 ratas, uno de adolescentes (pesos entre 75 y 100 g) y uno de adultos (pesos entre 200 y 225 g). Las ratas fueron alojadas con acceso a dieta estándar y agua *ad libitum* en condiciones ambientales controladas (22°C, 70% de humedad y ciclo de 12-12 h luz-oscuridad).

Antes de iniciar el procedimiento experimental, las ratas fueron habituadas al experimentador durante 2 días mediante manejo. El cuidado de los animales y los procedimientos experimentales fueron conducidos de acuerdo con las directrices éticas estándar (U.K. Animals, Scientific Procedures, Act, 1986 and European Communities Council Directiva 86/609/EEC) y fueron aprobadas por el Comité Local de Bioética (UIB-CAIB). Se realizaron todos los esfuerzos posibles para minimizar el número de ratas usadas y su sufrimiento. Todos los tratamientos fueron realizados entre las 8:00 y las 14:00 (ciclo de luz).

Las ratas fueron separadas en 2 grupos según edad (adolescente y adulto), y cada uno de estos grupos se separó en 3 subgrupos: Control (1), Agudo (2) y Crónico (3), con 6 ratas en cada uno de los subgrupos. Posteriormente, de manera paralela entre los 6 subgrupos, se llevó a cabo la administración del suero salino o de la droga. Este procedimiento se llevó a cabo entre PND 33-36 en adolescentes y PND 54-57 en adultas, es decir, un total de 4 días en ambos grupos. Se suministraron 3 dosis diarias separadas en 3h, ya fuese de suero salino (1 ml/kg) o de metanfetamina a concentración 5 mg/kg, diluida en una solución salina. En el grupo control, todas las dosis fueron de suero salino, en el grupo de agudo, solo se dio un día metanfetamina (el último) y el resto se suministró suero salino, mientras que en el crónico todas las dosis fueron de metanfetamina. La metanfetamina fue obtenida de Sigma-Aldrich (MO, USA). La vía de administración de la metanfetamina y el suero salino fue la vía intraperitoneal.

Las ratas fueron sacrificadas mediante decapitación sin anestesia en PND 58 (adultas) o 37 (adolescentes). Posteriormente se realizó la disección y se congeló inmediatamente el hemisferio izquierdo a -20°C en una solución de isopentano hasta ser almacenado a -80°C. El hemisferio derecho no fue utilizado para este experimento.

Para obtener las secciones del hipocampo se utilizó un criostato, con el cual se obtuvieron secciones de 30 µm a lo largo de todo el hipocampo. Para asegurar que no se perdía parte del giro dentado que se deseaba cuantificar, se cortó desde antes de que aparezca (anterior a Bregma -1,72 mm) hasta después de que el giro dentado se encuentre ya cerrado, punto en el que se deja de realizar el contaje (posterior a Bregma -5,80 mm). Se utilizó 1 de cada 8 secciones, que fueron fijadas en 3 portaobjetos con 8 secciones en cada uno, marcados como A1, A2 y A3, correspondiendo A1 a la zona anterior del hipocampo, A2 a la zona media, y A3 a la zona posterior. (Fig. 3). De esta manera, encontramos 6 ratas en cada subgrupo, por lo que tenemos 144 secciones por tratamiento y un total de 864 secciones, aunque algunas de estas son anteriores o posteriores al giro dentado, por lo que el número total de secciones contadas es algo inferior al mencionado. Las secciones obtenidas fueron rápidamente conservadas a -80°C.

57	41	25	9	##
49	33	17	1	A1

121	105	89	73	##
113	97	81	65	A2

185	169	153	137	##
177	161	145	129	A3

Figura 3: Orden utilizado para la adquisición de secciones mediante criostato.

INMUNOHISTOQUÍMICA

Ki-67 fue utilizado para el recuento de la proliferación celular (Del Bigio, 1999). Se realizó una inmunohistoquímica en las secciones de hipocampo (de 30 μm de grosor), que fueron fijadas en paraformaldehído 4%. La exposición del antígeno (10% citrato sódico pH 6,0; 90°C; 1 h) fue seguida por el bloqueo de las secciones mediante el uso de una solución peroxidasa (0,3%; 30 min) y BSA (albúmina de suero bovino) con un contenido de 1% de suero de cabra y 0,05% de Tritón X-100. Se utilizó un rotulador marcador especial ("pap pen"), que crea una barrera hidrofóbica para sellar el área donde se encontraban las secciones, con el objetivo de que el anticuerpo y el BSA solo difundieran en el área esperada. Posteriormente, las secciones fueron incubadas durante toda la noche con anticuerpo policlonal de conejo anti-Ki-67 (1:40000, proporcionado por los Drs. Huda Akil y Stan Watson, Universidad de Michigan).

A continuación, se llevó a cabo una incubación en anticuerpo secundario anti-conejo biotilizado 1:1000 (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Este anticuerpo se incubó finalmente con un complejo Avidina/Biotina (Vectastain Elite ABC kit; Vectors Laboratories), que se unía a las moléculas de Biotina del anticuerpo secundario, y ayuda a precipitar el cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB), que es añadido posteriormente. Finalmente, se realiza un lavado con PBS para detener la reacción. Todas las secciones fueron teñidas con cresil violeta para teñir los núcleos, deshidratadas en una cadena de alcoholes hasta etanol 100%, sumergidas en xileno y cubiertas con medio de montaje Permount®.

RECUESTO CELULAR

Para el conteo de las células de nueva proliferación se utilizó un microscopio (Leica DMR), utilizando un objetivo de 63x. El conteo fue realizado mediante ciego, de manera que cada portaobjetos estaba codificado con un número aleatorio dentro de un cierto rango (A1: 1-36; A2: 37-72; A3: 73-108). El número total de células contadas fue corregido mediante el área, que fue calculada utilizando un densitómetro (GS-800 Imaging Calibrated Densitometer, BioRad) y el programa Quantity One 1-D Analysis Software (Bio-Rad). Esta corrección se realizó para evitar que posibles diferencias entre las áreas totales de giro dentado de adultos y adolescentes pudiesen afectar al recuento celular, y además, pueden existir ciertos errores en el montaje de las secciones (especialmente durante el corte con el criostato, donde algunas secciones no se cortaban bien y eran inservibles) que afecten a los resultados. Todos los valores expresados en los resultados (excepto en la Figura 4b) están expresados como número de células por área (mm^2).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa GraphPad Prism, Version 6. Los resultados están expresados como valores medios \pm error estándar de la media (SEM). Las tablas fueron realizadas con el programa Microsoft Excel 2013, mientras que las gráficas fueron obtenidas del programa GraphPad Prism, Version 6.

Se utilizaron test t-student o ANOVA de 1 vía o de 2 vías, seguidos de un test post-hoc (Dunnett) dependiendo del número de grupos a analizar. Para el estudio de las diferencias en el Bregma se llevó a cabo un Test de Fisher. El nivel de significación para todos los test estadísticos fue $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

PROLIFERACIÓN CELULAR BASAL EN ADULTO Y ADOLESCENTE

Fueron encontradas diferencias significativas en los índices de proliferación celular basal por área (mm^2) en el hipocampo de rata adulta ($81,6 \pm 5,7$) y adolescente ($116,8 \pm 7,1$) mediante un test t-student ($p < 0,01$), siendo significativamente mayor en rata adulta. Se realizó una comparativa de la proliferación celular total a lo largo del bregma en el grupo adolescente y adulto control para estudiar en que puntos existen diferencias en los niveles de proliferación celular y, mediante un test de Fisher, se encontraron diferencias significativas en los puntos de Bregma $-3,14$ mm ($p < 0,05$), $-3,38$ mm ($p < 0,01$), $-4,82$ mm ($p < 0,01$) y $-5,06$ mm ($p < 0,001$) (Fig. 4).

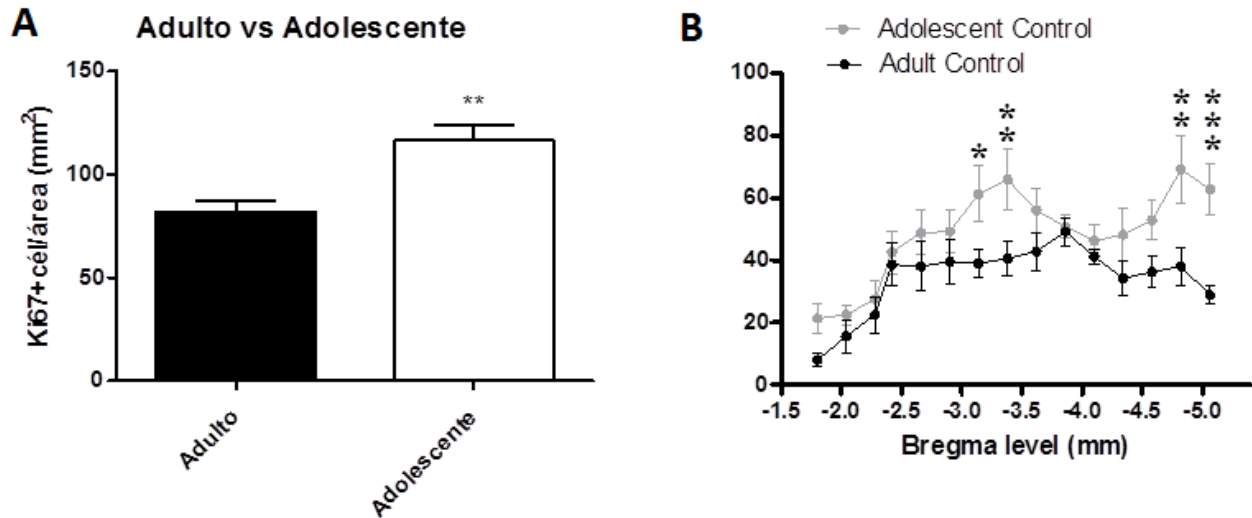


Figura 4: A) Proliferación celular basal en el giro dentado de rata adulta (PND 58) y adolescente (PND 37). Las columnas son la media \pm SEM del número de células de Ki-67 totales para cada rata y corregidas por el número de secciones cuantificadas y área analizada. Datos presentados como número de células por área (mm²) (#células/área (mm²)). Fueron encontradas diferencias significativas entre ambos grupos mediante la estadística t-student (** $p < 0,01$). B) Proliferación celular basal a lo largo del bregma (-1.80 mm hasta -5.06 mm) en rata adulta (PND 58) y adolescente (PND 37). Los puntos son la media \pm SEM del número de células de Ki-67 totales para cada rata en cada una de las secciones. Datos presentados como número medio de células por sección en los tratamientos control de adulto y adolescente. Las células fueron marcadas con Ki-67 y el conteo se realizó utilizando un microscopio a 63x.

EFFECTO AGUDO Y CRÓNICO DE LA METANFETAMINA SOBRE RATA ADULTA Y ADOLESCENTE

Se estudió la interacción entre la edad y el tratamiento mediante un test ANOVA de 2 vías, no encontrándose estadísticamente esta interacción ($F_{4,30}=0,26$ $p > 0,05$). Se realizó también un test ANOVA de 1 vía para estudiar las diferencias entre los subgrupos Control, Agudo y Crónico de adultos ($F_{2,15}=2,87$ $p > 0,05$) y adolescentes ($F_{2,15}=1,79$ $p > 0,05$), no encontrándose diferencias significativas en este test. Finalmente, se realizó una comparativa entre cada uno de los controles y el tratamiento agudo y crónico, mostrando una reducción de la proliferación celular por área en tratamiento crónico en adulto ($60,6 \pm 3,3$) respecto al control ($81,6 \pm 5,7$) mediante un test t-student de 2 colas ($p < 0,01$). No se encontraron efectos de reducción de la proliferación celular por área en tratamiento crónico en adolescente ($92,3 \pm 10,2$) respecto al control ($116,8 \pm 7,1$) ($p > 0,05$), ni en el tratamiento agudo de ninguno de los grupos utilizando un test t-student ($p > 0,05$) (Tabla 2, Fig. 5).

	Adulto			Adolescente		
	Control	Agudo	Crónico	Control	Agudo	Crónico
	78,4	52,4	58,2	98,9	100,0	59,1
	92,2	89,3	62,1	107,8	91,6	135,1
	86,4	50,6	49,8	142,2	146,5	92,3
	100,3	55,9	65,1	105,0	122,0	83,3
	67,2	72,3	55,3	134,4	73,7	85,3
	64,9	100,0	72,8	112,8	120,3	98,3
Media	81,6	70,1	60,6 **	116,8	109,0	92,3
Error estándar	5,7	8,5	3,3	7,1	10,5	10,2

Tabla 2: Proliferación celular (células marcadas con Ki-67) en respuesta a la administración de suero salino (4 días suero salino – 1 ml/kg, 3 dosis diarias), la administración de metanfetamina aguda (3 días salino (1 ml/kg) + 1 día metanfetamina – 5 mg/kg, 3 dosis diarias) o crónica (4 días metanfetamina – 5 mg/kg, 3 dosis diarias) en ratas adultas (PND 58) y adolescentes (PND 37). Datos presentados como número de células por área (#células/área (mm²)) en cada uno de los animales estudiados, corregidos por el total de secciones analizadas. Los valores medios obtenidos junto a sus respectivos errores estándar fueron utilizados para la realización de la Figura 5. No fueron encontradas diferencias significativas entre los grupos mediante la estadística ANOVA ($p>0,05$). Se encontró una disminución de la proliferación celular en el grupo de adultos tratados crónicamente mediante la realización de un test t-student (** $p<0,01$).

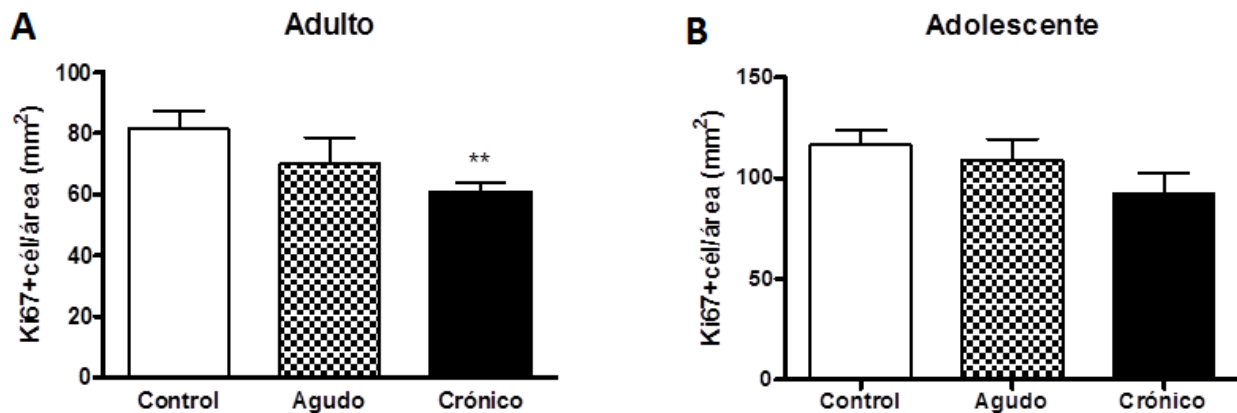


Figura 5: Proliferación celular (células marcadas con Ki-67) en respuesta a la administración de suero salino (4 días suero salino – 1 ml/kg, 3 dosis diarias), la administración de metanfetamina aguda (3 días salino (1 ml/kg) + 1 día metanfetamina – 5 mg/kg, 3 dosis diarias) o crónica (4 días metanfetamina – 5 mg/kg, 3 dosis diarias) en A) ratas adultas (PND 58) y B) ratas adolescentes (PND 38). Las columnas son la media \pm SEM del número de células de Ki-67 totales para cada rata y corregidas por el número de secciones cuantificadas. Datos presentados como número de células por área (#células/área (mm²)). A) Se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el crónico mediante la estadística t-student (** $p<0,01$), mientras que no se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el agudo ($p>0,05$) B) No fueron encontradas diferencias significativas entre ninguno de los grupos mediante la estadística t-student ($p>0,05$).

No se encontraron diferencias significativas entre las áreas de ninguno de los grupos mediante la realización de un test ANOVA de 1 vía ($F_{5,30}=0,71$ $p>0,05$) (Fig. 6).

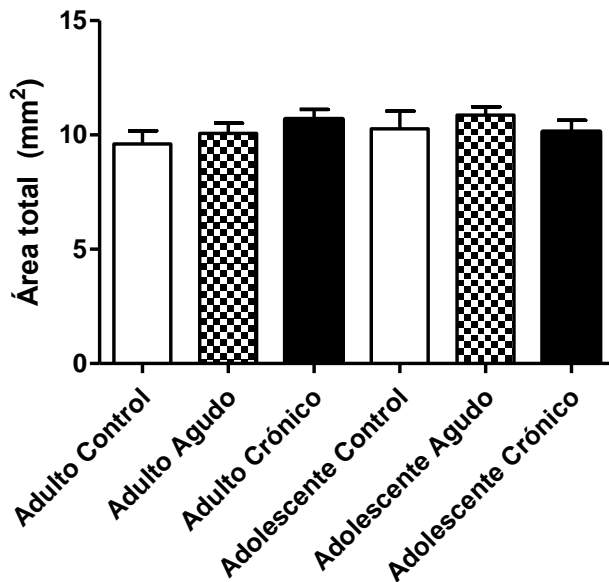


Figura 6: Área analizada de giro dentado (mm²) en cada subgrupo experimental, Control, Agudo y Crónico, de rata Adulta (PND 59) y Adolescente (PND 37). Los datos fueron obtenidos mediante la utilización de un densitómetro y el programa Quantity One, obteniendo el área total de cada una de las secciones. No se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos mediante la realización de un test ANOVA de 1 vía ($F_{5,30}=0,71$ $p>0,05$).

DISCUSIÓN

Los resultados del estudio muestran un descenso significativo de los niveles de proliferación celular en el giro dentado de ratas adultas frente a la administración crónica de metanfetamina, efecto que no se produce frente a la administración aguda, ni en ratas adolescentes en ninguno de los dos tratamientos, crónico o agudo. No se han encontrado diferencias significativas entre las áreas del giro dentado de ninguno de los grupos experimentales (Fig. 6), por lo que los resultados no pueden deberse a diferencias en el tamaño del giro dentado, ya que además se ha llevado a cabo una corrección por área para impedir esta posible circunstancia.

En concordancia con estudios anteriores, encontramos una proliferación basal notablemente mayor en adolescentes que en adultos (Fig. 4a), con una diferencia superior al 40% entre ambos grupos (similar a los resultados descritos por Molofsky et al., 2006). Esta concordancia con estudios anteriores nos permite comprobar que el procedimiento de tinción y recuento ha sido realizado correctamente. Además, encontramos una distribución de la proliferación celular a lo largo del bregma similar a la encontrada en estudios anteriores (García-Fuster, 2011), con las mayores diferencias entre adultos y adolescentes en la zona posterior del giro dentado (cercano a Bregma -5,00 mm), y un punto cercano a los -4,00 mm donde no existen diferencias entre ambos grupos, y ambas líneas convergen en un punto casi idéntico. Además, también encontramos diferencias notables entre Bregma -3,00 y -3,50 mm aproximadamente (Fig. 4b).

En ratas adultas se vio un importante descenso en la proliferación celular en respuesta a la administración crónica de metanfetamina, superior al 25% (Fig. 5). Este resultado difiere de los obtenidos por Maeda et al. en 2007, donde, en ratones, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de proliferación celular en respuesta a la administración crónica de metanfetamina, aunque las condiciones experimentales difieren notablemente de las nuestras, ya que se suministraba 1 mg/kg diariamente durante 14 días, lo que puede provocar esta diferencia entre ambos estudios. Como hemos comentado inicialmente, este efecto no se vio en el tratamiento agudo sobre las ratas adultas, donde no se encontraron diferencias significativas, a diferencia de lo observado en otros estudios, aunque en estos, la dosis suministrada a los animales era superior (25 mg/kg) y eran de edad más avanzada (PND 90 frente a PND 58) (Teuchert-Noodt, 2000). Ambos factores pueden afectar a que el efecto sea mayor en el estudio de Teuchert-Noodt que en el nuestro, ya que tanto la edad como la dosis administrada son factores importantes en cuanto a los niveles de proliferación celular y la respuesta a la metanfetamina.

De esta manera, vemos que existe un efecto importante de la dosis administrada, ya que, en ratones, en tratamientos crónicos de solo 1 mg/kg no hay diferencias, mientras que en tratamientos agudos con dosis superiores, de 25 mg/kg, sí que son visibles estas diferencias. Además, según lo observado en la bibliografía, la utilización de un paradigma de auto-administración también produce diferencias respecto a la administración estándar periódica (como la utilizada en nuestro estudio). Se deberían realizar más estudios para discernir el efecto de diferentes dosis sobre la proliferación celular, aunque ya hay evidencias de que existe un efecto significativo de ésta. Además, puede existir también un efecto del número de dosis diarias, ya que en un estudio realizado por Kochman et al. en 2009 se observó que tras un consumo en "atracción" (3 dosis), pero en este caso de solo 1,5 mg/kg cada dosis durante un solo día, había un descenso significativo de la proliferación celular en el giro dentado (Maeda et al. en 2007 no encuentran diferencias tras administrar 14 dosis diarias de 1 mg/kg). Este efecto solo se observaba si la administración se llevaba a cabo durante la fase de sueño de los animales de experimentación, mientras que si se administraba durante la fase activa, el efecto no se producía.

Este estudio nos puede llevar a pensar que la hora o fase del ciclo en la que se administra la droga afecta a los niveles de proliferación celular, y que la fase de descanso o de sueño tiene importancia en la neurogénesis (la administración de metanfetamina en la fase de sueño inhibía el reposo al ser un psicoestimulante). Algunos estudios muestran efectos de la privación del sueño en los niveles de neurogénesis, aunque son necesarios periodos de más de 48 h de privación para obtener resultados significativos (Meerlo et al., 2009), de manera que puede que exista una interacción entre ambos factores. Aun así, esta reducción podría ser debida al estrés, ya que la inhibición del sueño producida por los psicoestimulantes podría aumentar los niveles de estrés, que es un factor que afecta a los índices de proliferación celular disminuyéndolos notablemente (Klempin and Kempermann, 2007). En nuestro estudio, la metanfetamina ha sido administrada durante la fase de luz (y por tanto, de sueño), por lo que se esperaba que hubiese un efecto de disminución de la proliferación celular, como ha ocurrido en la administración crónica en adulto.

En cuanto a las ratas adolescentes, vemos que no existe efecto de reducción de la proliferación celular en el caso del tratamiento agudo ni en el crónico. Los efectos de la metanfetamina sobre la proliferación celular en el DG en ratas adolescentes no ha sido estudiada anteriormente en estudios comparativos con adultos, sino que estos estudios se han basado principalmente en adultos. En este estudio se ha

demostrado que la administración de metanfetamina no produce efectos significativos sobre la proliferación celular en las condiciones establecidas en el experimento, aunque como ya hemos comentado anteriormente, el efecto es variable dependiendo de la dosis, el patrón de administración y la hora de administración, ya que pueden afectar a los resultados observados.

En otros experimentos donde se han estudiado los efectos de la administración de metanfetamina en ratas adolescentes (estudios no relacionados con proliferación celular) se ha comprobado la existencia de una mayor resistencia en adolescentes respecto a adultos hacia los efectos negativos de esta droga (y otras anfetaminas), aunque nunca utilizando el índice de proliferación celular como marcador. La resistencia de los adolescentes a la metanfetamina se ha demostrado en varios experimentos, en los cuales se ve un menor descenso en los niveles basales de dopamina en el estriado a largo plazo tras el consumo crónico de metanfetamina (Kokoshka et al., 2000) y una menor respuesta hipertérmica y de inhibición de la recaptación de dopamina (Riddle et al., 2002). Aun así, la mayor resistencia parece ser aquella relacionada con los efectos a largo plazo (como el anteriormente mencionado descenso en los niveles basales de DA), ya que en efectos a corto plazo, la resistencia parece ser algo menor, produciéndose incrementos similares de DA. Estos resultados son sorprendentes si los comparamos con los de otras drogas como el alcohol, donde los adolescentes presentan una sensibilidad mucho más elevada frente a los efectos tóxicos de su ingesta que los adultos, y concretamente en el efecto estudiado, la proliferación celular en el giro dentado, los efectos son superiores en adolescentes que en adultos (Morris et al., 2010), presentando además estas afectaciones de diferente manera, por ejemplo afectando a la expresión de 49 genes diferentes en el cerebro adolescente, entre ellos enzimas antioxidantes y produciendo una mayor activación de la caspasa 3 (Lacaille et al., 2014).

Esta resistencia de los adolescentes a los efectos tóxicos de la metanfetamina puede deberse a diversos factores, tales como las diferencias farmacocinéticas entre adultos y adolescentes (Spear, 2000), un mayor contenido basal de dopamina en adultos que produce que ya estén “en situación de riesgo” frente a posibles aumentos de los niveles de dopamina como los observados frente al consumo de drogas como la metanfetamina, y por influencia de VMAT-2, ya que los mayores niveles de dopamina, unidos a la pérdida de efecto de VMAT-2 pueden provocar la oxidación de dopamina que resulte en efectos perjudiciales para el organismo (Truong et al., 2005).

La resistencia observada en la bibliografía se mantiene en el presente estudio, y se podrían realizar estudios similares al llevado a cabo donde, además de los niveles de proliferación celular, se estudien factores como los niveles de VMAT-2, los niveles de dopamina y los factores farmacocinéticos (comparar las concentraciones que llegan al cerebro principalmente) para tratar de establecer una relación entre todos estos factores y la proliferación celular. En conclusión, son necesarios más estudios para tratar de discernir a que se debe exactamente esta resistencia a la metanfetamina en adolescentes, y estudiar si los factores que provocan esta resistencia podrían ser útiles de cara a tratamientos que busquen inhibir los efectos perjudiciales de la metanfetamina.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que la administración crónica de metanfetamina produce un efecto de disminución de la proliferación celular en el DG de ratas adultas (PND 58), efecto que no se ve en ratas adolescentes (PND 37), lo que, unido a estudios anteriores, demuestran la existencia de una cierta resistencia por parte del cerebro adolescente a la acción de la metanfetamina. Además, este efecto no fue significativo en caso de tratamiento agudo en ninguno de los dos casos, lo que sugiere también que el efecto está relacionado con el paradigma de administración utilizado, que podría ser equivalente, en humanos, a los distintos hábitos de consumo existentes.

AGRADECIMIENTOS

El estudio fue realizado en el Laboratorio de Neurofarmacología de l'Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS). Agradecimiento especial a Rubén García Cabrerizo, estudiante de tesis doctoral en el laboratorio, y al resto del grupo por la colaboración y ayuda prestada durante el desarrollo del trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. Baptista, S., Lasgi, C., Benstaali, C., Milhazes, N., Borges, F., Fontes-Ribeiro, C., ... & Silva, A. P. (2014). Methamphetamine decreases dentate gyrus stem cell self-renewal and shifts the differentiation towards neuronal fate. *Stem cell research*, 13(2), 329-341.
2. Beckett, A. H., Salmon, J. A., & Mitchard, M. (1969). The relation between blood levels and urinary excretion of amphetamine under controlled acidic and under fluctuating urinary pH values using [14C] amphetamine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 21(4), 251-258.
3. Bento, A. R., Baptista, S., Malva, J. O., Silva, A. P., & Agasse, F. (2011). Methamphetamine exerts toxic effects on subventricular zone stem/progenitor cells and inhibits neuronal differentiation. *Rejuvenation research*, 14(2), 205-214.
4. Black, Y. D., Green-Jordan, K., Eichenbaum, H. B., & Kantak, K. M. (2004). Hippocampal memory system function and the regulation of cocaine self-administration behavior in rats. *Behavioural brain research*, 151(1), 225-238.
5. Cameron, H. A., & McKay, R. D. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *Journal of Comparative Neurology*, 435(4), 406-417.
6. Canales, J. J. (2007). Adult neurogenesis and the memories of drug addiction. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, 257(5), 261-270.
7. Cao, L., Jiao, X., Zuzga, D. S., Liu, Y., Fong, D. M., Young, D., & During, M. J. (2004). VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. *Nature genetics*, 36(8), 827-835.
8. Clelland, C. D., Choi, M., Romberg, C., Clemenson, G. D., Fagniere, A., Tyers, P., ... & Bussey, T. J. (2009). A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science*, 325(5937), 210-213.

9. Cox, B. M., Shah, M. M., Cichon, T., Tancer, M. E., Galloway, M. P., Thomas, D. M., & Perrine, S. A. (2014). Behavioral and neurochemical effects of repeated MDMA administration during late adolescence in the rat. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 48, 229-235.
10. Crews, F. T., Mdzinarishvili, A., Kim, D., He, J., & Nixon, K. (2006). Neurogenesis in adolescent brain is potently inhibited by ethanol. *Neuroscience*, 137(2), 437-445.
11. Del Bigio, M. R. (1999). Proliferative status of cells in adult human dentate gyrus. *Microscopy research and technique*, 45(6), 353-358.
12. Diaz, J., Ridray, S., Mignon, V., Griffon, N., Schwartz, J. C., & Sokoloff, P. (1997). Selective expression of dopamine D3 receptor mRNA in proliferative zones during embryonic development of the rat brain. *The Journal of neuroscience*, 17(11), 4282-4292.
13. Ekthuwapranee, K., Sotthibundhu, A., & Govitrapong, P. (2015). Melatonin attenuates methamphetamine - induced inhibition of proliferation of adult rat hippocampal progenitor cells in vitro. *Journal of pineal research*, 58(4), 418-428.
14. Fleckenstein, A. E., Volz, T. J., Riddle, E. L., Gibb, J. W., & Hanson, G. R. (2007). New insights into the mechanism of action of amphetamines. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 47, 681-698.
15. Fuchs, R. A., Evans, K. A., Ledford, C. C., Parker, M. P., Case, J. M., Mehta, R. H., & See, R. E. (2005). The role of the dorsomedial prefrontal cortex, basolateral amygdala, and dorsal hippocampus in contextual reinstatement of cocaine seeking in rats. *Neuropsychopharmacology*, 30(2), 296-309.
16. Gage, F. H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science*, 287(5457), 1433-1438.
17. Garcia-Fuster, M. J., Perez, J. A., Clinton, S. M., Watson, S. J., & Akil, H. (2010). Impact of cocaine on adult hippocampal neurogenesis in an animal model of differential propensity to drug abuse. *European Journal of Neuroscience*, 31(1), 79-89.
18. Garcia-Fuster, M. J., Flagel, S. B., Mahmood, S. T., Mayo, L. M., Thompson, R. C., Watson, S. J., & Akil, H. (2011). Decreased proliferation of adult hippocampal stem cells during cocaine withdrawal: possible role of the cell fate regulator FADD. *Neuropsychopharmacology*, 36(11), 2303-2317.
19. Gold, L. H., Geyer, M. A., & Koob, G. F. (1989). Neurochemical mechanisms involved in behavioral effects of amphetamines and related designer drugs. *NIDA Res Monogr*, 94, 101-126.
20. Harvey, J. A. (2004). Cocaine effects on the developing brain: current status. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 27(8), 751-764.
21. Hayes, A. W., & Kruger, C. L. (Eds.). (2014). *Hayes' principles and methods of toxicology*. CRC Press.
22. Kempermann, G., Gast, D., Kronenberg, G., Yamaguchi, M., & Gage, F. H. (2003). Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development*, 130(2), 391-399.
23. Kish, S. J. (2008). Pharmacologic mechanisms of crystal meth. *Canadian Medical Association Journal*, 178(13), 1679-1682.

24. Klempin, F., & Kempermann, G. (2007). Adult hippocampal neurogenesis and aging. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, 257(5), 271-280.
25. Kochman, L. J., Fornal, C. A., & Jacobs, B. L. (2009). Suppression of hippocampal cell proliferation by short-term stimulant drug administration in adult rats. *European Journal of Neuroscience*, 29(11), 2157-2165.
26. Kokoshka, J. M., Fleckenstein, A. E., Wilkins, D. G., & Hanson, G. R. (2000). Age-Dependent Differential Responses of Monoaminergic Systems to High Doses of Methamphetamine. *Journal of neurochemistry*, 75(5), 2095-2102.
27. Koob, G. F., & Le Moal, M. (1997). Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science*, 278(5335), 52-58.
28. Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 217-238.
29. Kuhn, D. M., Francescutti-Verbeem, D. M., & Thomas, D. M. (2006). Dopamine Quinones Activate Microglia and Induce a Neurotoxic Gene Expression Profile. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1074(1), 31-41.
30. LaVoie, M. J., & Hastings, T. G. (1999). Dopamine quinone formation and protein modification associated with the striatal neurotoxicity of methamphetamine: evidence against a role for extracellular dopamine. *The Journal of neuroscience*, 19(4), 1484-1491.
31. Limoli, C. L., Giedzinski, E., Baure, J., Rola, R., & Fike, J. R. (2006). Altered growth and radiosensitivity in neural precursor cells subjected to oxidative stress. *International journal of radiation biology*, 82(9), 640-647.
32. Maeda, K., Sugino, H., Hirose, T., Kitagawa, H., Nagai, T., Mizoguchi, H., ... & Yamada, K. (2007). Clozapine prevents a decrease in neurogenesis in mice repeatedly treated with phencyclidine. *Journal of pharmacological sciences*, 103(3), 299-308.
33. Manda, K., & Reiter, R. J. (2010). Melatonin maintains adult hippocampal neurogenesis and cognitive functions after irradiation. *Progress in neurobiology*, 90(1), 60-68.
34. Mandyam, C. D., Wee, S., Crawford, E. F., Eisch, A. J., Richardson, H. N., & Koob, G. F. (2008). Varied access to intravenous methamphetamine self-administration differentially alters adult hippocampal neurogenesis. *Biological psychiatry*, 64(11), 958-965.
35. Mandyam, C. D., & Koob, G. F. (2012). The addicted brain craves new neurons: putative role for adult-born progenitors in promoting recovery. *Trends in neurosciences*, 35(4), 250-260.
36. Meerlo, P., Mistlberger, R. E., Jacobs, B. L., Heller, H. C., & McGinty, D. (2009). New neurons in the adult brain: the role of sleep and consequences of sleep loss. *Sleep medicine reviews*, 13(3), 187-194.
37. Molofsky, A. V., Slutsky, S. G., Joseph, N. M., He, S., Pardal, R., Krishnamurthy, J., ... & Morrison, S. J. (2006). Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature*, 443(7110), 448-452.
38. Morris, S. A., Eaves, D. W., Smith, A. R., & Nixon, K. (2010). Alcohol inhibition of neurogenesis: a mechanism of hippocampal neurodegeneration in an adolescent alcohol abuse model.

- Hippocampus, 20(5), 596-607.
39. Noonan, M. A., Bulin, S. E., Fuller, D. C., & Eisch, A. J. (2010). Reduction of adult hippocampal neurogenesis confers vulnerability in an animal model of cocaine addiction. *The Journal of Neuroscience*, 30(1), 304-315.
 40. Ricaurte, G., Bryan, G., Strauss, L., Seiden, L., & Schuster, C. (1985). Hallucinogenic amphetamine selectively destroys brain serotonin nerve terminals. *Science*, 229(4717), 986-988.
 - Riddle, E. L., Kokoshka, J. M., Wilkins, D. G., Hanson, G. R., & Fleckenstein, A. E. (2002). Tolerance to the neurotoxic effects of methamphetamine in young rats. *European journal of pharmacology*, 435(2), 181-185.
 41. Savin-Williams, R. C. (1987). *Adolescence: An ethological perspective*. Springer-Verlag Publishing.
 42. Scholzen, T., & Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology*, (182), 311-22.
 43. Seiden, L. S., Commins, D. L., Vosmer, G., Axt, K., & Marek, G. (1988). Neurotoxicity in Dopamine and 5 - Hydroxytryptamine Terminal Fields: A Regional Analysis in Nigrostriatal and Mesolimbic Projections. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 537(1), 161-172.
 44. Teuchert-Noodt, G., Dawirs, R. R., & Hildebrandt, K. (2000). Adult treatment with methamphetamine transiently decreases dentate granule cell proliferation in the gerbil hippocampus. *Journal of neural transmission*, 107(2), 133-143.
 45. Thompson, P. M., Hayashi, K. M., Simon, S. L., Geaga, J. A., Hong, M. S., Sui, Y., ... & London, E. D. (2004). Structural abnormalities in the brains of human subjects who use methamphetamine. *The Journal of neuroscience*, 24(26), 6028-6036.
 46. Truong, J. G., Wilkins, D. G., Baudys, J., Crouch, D. J., Johnson-Davis, K. L., Gibb, J. W., ... & Fleckenstein, A. E. (2005). Age-dependent methamphetamine-induced alterations in vesicular monoamine transporter-2 function: implications for neurotoxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 314(3), 1087-1092.
 47. Van Praag, H., Shubert, T., Zhao, C., & Gage, F. H. (2005). Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *The Journal of Neuroscience*, 25(38), 8680-8685.
 48. Varlinskaya, E. I., & Spear, L. P. (2004). Acute Ethanol Withdrawal (Hangover) and Social Behavior in Adolescent and Adult Male and Female Sprague-Dawley Rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 28(1), 40-50.
 49. Venkatesan, A., Uzasci, L., Chen, Z., Rajbhandari, L., Anderson, C., Lee, M. H., ... & Nath, A. (2011). Impairment of adult hippocampal neural progenitor proliferation by methamphetamine: role for nitrotyrosination. *Mol Brain*, 4, 28.
 50. Vorhees, C. V., Reed, T. M., Morford, L. L., Fukumura, M., Wood, S. L., Brown, C. A., ... & Williams, M. T. (2005). Periadolescent rats (P41–50) exhibit increased susceptibility to D-methamphetamine-induced long-term spatial and sequential learning deficits compared to juvenile (P21–30 or P31–40) or adult rats (P51–60). *Neurotoxicology and teratology*, 27(1), 117-134.
 51. Wagner, G. C., Ricaurte, G. A., Seiden, L. S., Schuster, C. R., Miller, R. J., & Westley, J. (1980).

Long-lasting depletions of striatal dopamine and loss of dopamine uptake sites following repeated administration of methamphetamine. *Brain research*, 181(1), 151-160.

52. Yamaguchi, M., Suzuki, T., Seki, T., Namba, T., Juan, R., Arai, H., Hori, T. & Asada, T. (2004) Repetitive cocaine administration decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 1025, 351–362.
53. Ming, G. L., & Song, H. (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.*, 28, 223-250.